



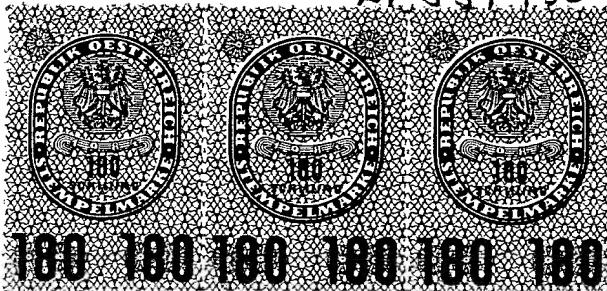
PCT/AT 99/00150

09/719404

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1014 WIEN, KOHLMARKT 8 - 10

AT 99/150



REC'D 20 JUL 1999

WIPO PCT

5
Aktenzeichen A 701/99

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

Dr. Franz GABOR
in A-3385 Gerersdorf, Am Schmiedberg 7
(Niederösterreich) und
Dr. Michael WIRTH
in A-1160 Wien, Hubergasse 11,

am 20. April 1999 eine Patentanmeldung betreffend

"Pharmazeutisches Präparat",

überreicht haben und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten Beschreibung samt Zeichnungen übereinstimmt.

Diese Patentanmeldung, die das Aktenzeichen A 701/99 erhalten hat, ist eine Ausscheidungsanmeldung aus der Patentanmeldung A 1009/98. Gemäß § 92a Abs. 5 PatG kommt der Patentanmeldung A 701/99 als Anmeldetag der 10. Juni 1998 zu, das ist der Tag, an dem der Gegenstand der Ausscheidungsanmeldung im Verfahren über die Patentanmeldung A 1009/98 geoffenbart worden ist.

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Österreichisches Patentamt

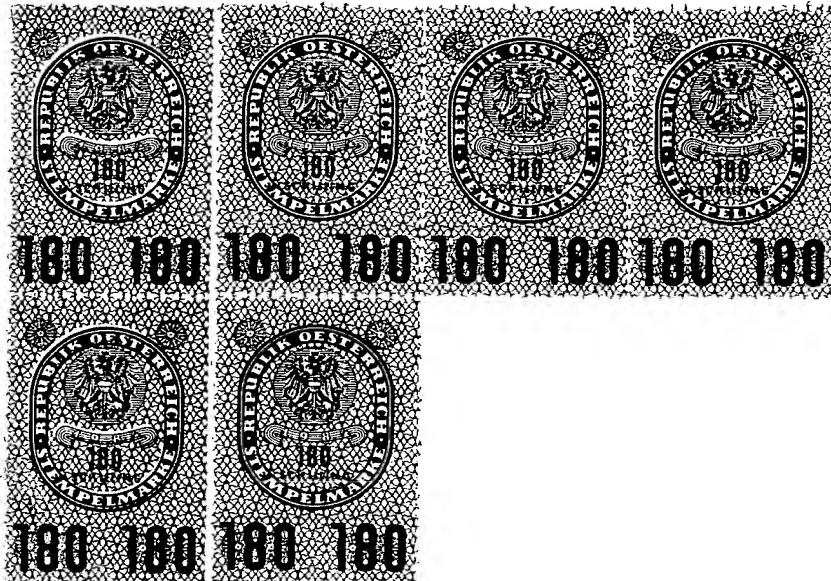
Wien, am 23. Juni 1999

Der Präsident:

1. A.

Kanzleirat FÜHLINGER





ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Verwaltungsstellen-Direktion

.....600..... S
Kanzleigebühr bezahlt.

Baumann

A 701/99-1

0108008
Int. Cl.:

R 35406

Urtext

AT PATENTSCHRIFT

⑪ Nr.

⑦ Patentinhaber: GABOR Franz, Dr.
Gerersdorf (AT)

WIRTH Michael, Dr.
Wien (AT)

⑤ Gegenstand : Pharmazeutisches Präparat

⑥ Zusatz zu Patent Nr.

⑦ Umwandlung aus GM

⑧ Ausscheidung aus : A 1009/98 (Kl. A61K, Dr. Mazzucco)

⑨ ⑩ Angemeldet am: 1998 06 10

⑪ ⑫ ⑬ Unionspriorität :

⑭ Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

⑮ Ausgegeben am :

⑯ Erfinder :

⑰ Abhängigkeit:

⑲ Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

Die Erfindung betrifft pharmazeutische Präparationen umfassend Lektine und pharmazeutische Wirkstoffe.

Das Konzept des "Drug Targeting" ist durch die Tatsache begründet, daß viele Arzneimittel in bezug auf deren Aufnahme- oder Wirkungsloci in den Zellen nicht selektiv sind. Besonders auf dem Gebiet der Chemotherapie bei Krebserkrankungen führt die Wirkung der eingesetzten Arzneimittelsubstanzen in Nicht-Zielzellen zu schweren unerwünschten Nebenwirkungen, die eine erfolgreiche Therapie gefährden können (1). Die Verwirklichung der gezielten Zuführung von Arzneimittelsubstanzen zu den spezifischen Zielzellen wurde bislang durch große Schwierigkeiten bei der Auffindung geeigneter Carrier-Moleküle, die in eine spezifische Wechselwirkung mit der betroffenen (Ziel-)Zelle treten können, gehindert. Mit dem Fortschritt in der Biotechnologie wurden monoklonale Antikörper (2) und rekombinante Proteine (3), welche spezifisch an bestimmte Loci binden können, als vielversprechende Kandidaten für aktive und zielgerichtete Arzneimittelzufuhr etabliert. Weiters wurden auch kolloidale Partikel, wie Albumin- oder Polystyrol-Mikrokügelchen, für passiven Arzneimittel-Transport in bestimmte Kompartimente verwendet (4,5).

Lektine, die eine wichtige Rolle bei der biologischen Signalübermittlung, bei Zell/Zell- und Zell/Matrix-Wechselwirkungen spielen, sind eine weitere Gruppe von Molekülen, von denen man annimmt, daß sie zur zielgerichteten Arzneimittel-Verabreichung verwendet werden können. Es ist bekannt, daß Lektine, die ursprünglich als Proteine in Pflanzenextrakten identifiziert worden waren, in der Lage sind, an bestimmte Oligosaccharid-Gruppen zu binden (6). Es wurde vorgeschlagen, unter Ausnutzung dieser Kohlehydrat-spezifischen Wechselwirkung Lektine in einem zielgerichteten "Drug Delivery"-System einzusetzen (7), da das Glykosylierungsmuster von Zellen nach maligner Transformation verändert ist (8).

Weizenkeim-Agglutinin (wheat germ agglutinin; WGA) ist ein dimeres, Kohlehydrat-freies Protein, welches aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 35 kDa besteht. Jede monomere Untereinheit enthält zwei identische und unabhän-

gige Bindungsstellen für N-Acetyl-D-glukosamin (9). Nachdem Weizenkeime, die rund 300 mg WGA pro kg enthalten (10), zur normalen Ernährung des Menschen gehören, ist die perorale Toxizität zu vernachlässigen. WGA bindet spezifisch an N-Acetyl-D-glukosamin-hältige Strukturen. Es wurde durch Sättigungsanalysen mit Fluoreszenz-markiertem Lektin gefunden, daß die WGA-Bindungskapazität von Colonkarzinom-Zellen (Caco-2-Zellen) rund 13mal höher ist als die von menschlichen Colonozyten (11).

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine pharmazeutische Präparation zur Verfügung zu stellen, mit welcher die Vorteile des Lektin-Systems bei der Zielzellenerkennung für die zielgerichtete Zufuhr von Arzneimitteln an spezifische Zielzellen ausgenützt werden können, ohne daß es dabei zu wesentlichen Nebenwirkungen, insbesondere zu toxischen Nebenwirkungen oder Nebenwirkungen, die durch Wirkung auf Nicht-Zielzellen hervorgerufen werden, kommt. Insbesondere soll dieses System bei der Behandlung von Krebserkrankung wirksam eingesetzt werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein pharmazeutisches Präparat, welches ein Lektin, an das aus Blut gewinnbares Protein, insbesondere in Blutgerinnungsfaktor oder dessen rekombinantes Äquivalent verabreichungsstabil gebunden ist, umfaßt.

Als Lektin wird bevorzugterweise ein Lektin verwendet, das pflanzlichen Ursprungs ist, wobei vor allem solche Pflanzenlektine verwendet werden können, die als gewohnte Nahrungsmittelquellen des Menschen bekannt sind, wie z.B. auch Weizen, Soja, Reis, Bohnen, Gerste, Roggen, usw.. Die Spezifität von Lektinen ist für die meisten bekannten Lektine bereits ausreichend beschrieben (vgl. Stryer, Biochemistry, 2. Auflage (1994), Seiten 311 und 359; Römpf, Chemielexikon, 10. Auflage (1997), Seiten 2382 bis 2384), kann jedoch auch (z.B. für neu entdeckte Lektine oder für modifizierte Lektine) mit bekannten Methoden analysiert werden. Dies gilt insbesondere für die jeweiligen Bindungsspezifitäten für bestimmte Kohlehydratstrukturen von ausgewählten Zielzellen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kommen auch bevorzugt sol-

che Lektine zum Einsatz, die lang bekannt und gut beschrieben sind, wie z.B. Concanavalin A, Abrin, Ricin, Phasin oder WGA, da bei diesen Systemen auch Modifikationen ohne größeren Aufwand bewerkstelligt werden können. Derartige Modifikationen (z.B. bezüglich der Bindungsstelle zum aus Blut gewinnbaren Protein oder im Erkennungsbereich für die Kohlehydratstruktur der Zielzelle) können zwar auch bei weniger gut beschriebenen oder völlig neuen Lektinen mit Methoden, die dem Fachmann bekannt sind, bewerkstelligt werden, jedoch ist dies meist arbeitsaufwendiger als bei bekannten Lektinen.

Erfindungsgemäß hat sich der Einsatz von WGA besonders bewährt, da dieses praktisch keinerlei perorale Toxizität aufweist und eine hohe Spezifität gegenüber malignen Zellen aufweist. Insbesondere aufgrund der hohen Spezifität gegenüber Colonkarzinom-Zellen ist es besonders bei der zielgerichteten Arzneimittelzufuhr in diese Zellen geeignet. Unter WGA werden erfundungsgemäß auch chemisch modifizierte WGA-Moleküle oder WGA-Derivate verstanden, die die wesentlichen Eigenschaften des (nativen) WGA aufweisen bzw. bei welchen die Bindungsspezifität gezielt und kontrolliert verändert worden ist.

Unter verabreichungsstabiler Verbindung wird erfundungsgemäß eine Verbindung verstanden, die eine ausreichende Stabilität des erfundungsgemäßen Präparats bei der Lagerung, bei der Verabreichung und beim Weg im Patienten zum Ziellocus gewährt. Wesentlich ist aber auch, daß diese Verbindung zwischen Lektin und dem aus Blut gewinnbaren Protein im Zielkompartiment gespalten werden kann, oder der Arzneistoff auf andere Weise seine Wirkung entfalten kann. Demgemäß kommen beispielsweise eine säure- oder basenlabile Verbindung oder eine durch ein für die Zielkompartimente spezifisches Enzym, z.B. eine Protease oder Nuklease, spaltbare Verbindung zur Anwendung. Unter Zielkompartimenten werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise Zellen, Gewebe oder Teile eines Gewebes, insbesondere Blut oder Gewebsflüssigkeiten, verstanden.

Die erfundungsgemäßen Präparate zeigen einen hohen antiproliferativen Effekt auf die Zielzellen, da das konjugierte aus Blut

gewinnbare Protein leicht und effektiv in die Zielzelle bzw. die Zielkompartimente aufgenommen wird. Es kommt daher zu einer intrazellulären Akkumulation der erfindungsgemäßen Präparate. Im WGA-System ermöglicht die säurelabile cis-Aconityl-Verbindung eine Freisetzung des aus Blut gewinnbaren Proteins erst im lysosomalen Bereich der Zielzelle.

Als aus Blut gewinnbares Protein zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist prinzipiell jedes Blutprotein oder dessen rekombinantes Äquivalent geeignet, das eine Bindung mit Lektinen eingehen kann. Diese Bindung kann auch, wenn sie mit den nativen Lektinen nicht möglich ist, durch Modifikation von bestimmten Bindungsstellen oder Aminosäure-Seitenketten ermöglicht werden. Auch können, ausgehend von bekannten aus Blut gewinnbaren Proteinen, speziell für die vorliegende Erfindung geeignete abgeleitete Blutproteine "designed" werden, die eine Bindung mit Lektinen eingehen können. Aufgrund der abnormen Veränderung der Glykocalyx (die gewebsspezifische Polysaccharidschicht, die jede Eukaryonten-Zelle umgibt und aus membranständigen Glykoproteinen und Glykolipiden aufgebaut ist), die oft mit einer malignen Transformation verbunden ist, eignet sich das erfindungsgemäße Lektin- "Drug-Targeting" hervorragend zur Verabreichung von Zytostatika oder anderen Krebs-Behandlungsmitteln.

Diese Substanzen, z.B. Doxorubicin (DOX), können vorteilhaftweise über eine säurelabile Bindung (z.B. die cis-Aconityl-Brücke an WGA) gebunden werden und können als Modellbeispiel ebenfalls zur Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung herangezogen werden. Es zeigte sich, daß eine Zweischritt-Koppungsreaktion (siehe Beispiele) von DOX an WGA ein wasserlösliches Prodrug (DOX-WGA) mit einem Substitutionsgrad von 24 mol DOX/mol WGA ergibt. Dieses Prodrug ist im neutralen Milieu stabil, bei pH 4,0 werden jedoch innerhalb von 24 Stunden $46 \pm 7\%$ des WGA-gebundenen DOX freigesetzt. Damit wird das Zytostatikum erst im intralysosomalen, sauren Milieu verfügbar. Die DOX-WGA-Bindungskapazität von Colonkarzinom-Zellen ist zumindest 4,5mal höher als jene von humanen Colonozyten und lymphoblastischen MOLT-4-Zellen, eine Bindung an Erythrozyten ist nicht meßbar.

Unter Berücksichtigung der Freisetzungsraten des Arzneistoffes aus dem Konjugat ist die zytostatische Wirkung des Arzneistoffes in Konjugatform auf Karzinomazellen zumindest 1,5mal höher als jene des freien Zytostatikums. Die antiproliferative Wirkung von DOX-WGA auf Lymphoblasten ist hingegen um 65% geringer als jene des freien Wirkstoffes. Im Gegensatz zum freien Wirkstoff wird aber durch die erfindungsgemäße zielgerichtete Zuführung eine enorme Verringerung der Nebenwirkungsrate ermöglicht, sei es durch die geringere Beeinträchtigung von Nicht-Zielzellen oder sei es durch einen verringerten Einsatz des Zytostatikums (durch Dosisreduktion). Damit wird die Therapie des Tumors, z.B. die Therapie des Colonkarzinoms durch DOX-WGA, um vieles angenehmer.

Da Arzneimittel auf Proteinbasis, durch den Verbund mit den Lektinen zusätzlich zur zielgerichteten Verabreichung auch z.T. erheblich stabilisiert werden, was bei fragilen Proteinarzneimittern sehr hilfreich sein kann, können mit dem erfindungsgemäßen System durch die Kopplung an Lektine erfolgreich und gezielt hochmolekulare Proteinarzneimittel, wie Blutgerinnungsfaktoren oder andere aus Blut gewinnbare Proteine, wie Inhibitoren oder Cofaktoren, oder deren rekombinante Äquivalente verabreicht werden.

Da die meisten Lektine, insbesondere pflanzliche, wie WGA, gastrointestinal stabil sind, können daher die erfindungsgemäßen Präparate peroral verabreicht werden, wobei lediglich gegebenenfalls eine übliche magensaftresistente Hüllschicht vorgesehen werden kann, was zu einer weiteren Erleichterung der Therapie führt.

Das erfindungsgemäße System eignet sich auch hervorragend zur Verabreichung von Nukleinsäuren, beispielsweise zur Gentherapie oder für Antisense-Therapie. Hierbei kann die Nukleinsäure, z.B. cDNA, Antisense-RNA, ..., wie ein normales Blutprotein an das Lektin gebunden werden. Bei WGA kann dies selbstverständlich auch über die säurelabile Bindungsstelle erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Präparate werden bevorzugterweise in den üblichen und für das jeweilige aus Blut gewinnbare Protein günstigen

stigen Verabreichungsformen zur Verfügung gestellt. Die Dosierung kann sich an der üblichen Dosierung für das Protein orientieren, wobei, bedingt durch die effizientere Verabreichung, eine Dosisreduktion in Erwägung gezogen werden kann. Auch können die üblichen, bewährten Hilfssubstanzen für das Medikament verwendet werden, oft ist aber mit der erfindungsgemäßen Formulierung eine verbesserte Wasserlöslichkeit (bedingt durch die Lektine) verbunden, womit z.B. Lösungsvermittler reduziert oder sogar weggelassen werden können. Auch kann durch die erhöhte Stabilität der erfindungsgemäßen Präparate die Verwendung großer Mengen an Stabilisatoren vermieden werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und den Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht eingeschränkt sein soll, näher erläutert.

B e i s p i e l e :

Materialien und Methoden

Chemikalien

Weizenkeim-Agglutinin aus *Triticum vulgare* und sein Fluorescein-markiertes Analogon (Molverhältnis Fluorescein/Protein = 3,2) wurde von Vektor Laboratories (Burlingame, U.S.A.) erworben. Doxorubicin, cis-Aconitsäureanhydrid, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, ϵ -Amino-n-capronsäure und N-Hydroxysuccinimid wurden von Sigma (St.Louis, MO, U.S.A.) erhalten; alle anderen Chemikalien wurden als analytisch rein ("analytical grade") von Merck (Darmstadt, DE) erworben. Die Gewebskulturreagentien stammten von Biowhittaker (Workingham, UK), Sets für XTT- (EZ4U) und BrdU-Test wurden von Biomedica (Wien, Österreich) bzw. Boehringer Mannheim (Wien, Österreich) erworben.

Konjugation von Doxorubicin mit WGA

N-cis-Aconityl-doxorubicin wurde gemäß Yang und Reisfeld (12) mit Modifikationen hergestellt. Alle Reaktionen wurden unter Lichtschutz durchgeführt und mittels DC auf KGF₂₅₄ unter Verwendung von Chloroform/Methanol/Wasser 9+9+1,8 oder 8+10+2,5

(V/V/V) als mobile Phase überwacht. DOX (1,79 µmol) wurden in 1,5 ml Methanol gelöst und mit einer etherischen Lösung von cis-Aconitinsäureanhydrid (5,2 µmol) 1 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Eindampfen auf 500 µl wurde Doxorubicin-cis-aconitat durch Umsetzung mit 7,2 µmol N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid und 7,2 µmol N-Hydroxysuccinimid aktiviert. Die Reaktionsmischung wurde 2 h lang bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C gerührt. Dicyclohexylharnstoff wurde durch Zugabe von 1 ml 3% wässriger Natriumbicarbonat-Lösung ausgefällt und durch 5minütige Zentrifugation bei 7500 U/min gesammelt. Das restliche Methanol wurde aus dem Überstand durch Abdampfen entfernt.

Der Doxorubicin-cis-aconitat-N-hydroxysuccinimid-ester wurde durch tropfenweise Zugabe einer Lösung enthaltend 0,033 µmol WGA in 500 µl 3% wässrigem Natriumbicarbonat, pH 8,0, mit WGA konjugiert. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurde das Konjugat (DOX-WGA) gegen 20 mM HEPES/NaOH-Puffer, pH 7,4, bei 4°C dialysiert, bis kein freies Arzneimittel mittels spektrophotometrischer Untersuchung des Dialyse-Mediums bei 468 nm nachgewiesen wurde (Detektionsgrenze: 2 µg/ml DOX). Nach DC war DOX-WGA die einzige fluoreszierende Verbindung, die beobachtet wurde, was darauf hinweist, daß kein detektierbares freies DOX vorhanden war.

Ermittlung der Kopplungsrate

Die Anzahl von DOX-Molekülen, die pro Molekül WGA gekoppelt sind, wurde aus der Absorption bei 468 nm in bezug auf WGA in 20 mM HEPES-Puffer, pH 7,4, errechnet, wobei DOX zur Eichung verwendet wurde (U-3000 UV-VIS Spektrophotometer, Hitachi).

Bestimmung von Amino-Resten an WGA

Die Gesamtanzahl von WGA-Aminogruppen, die einer Derivatisierung zugänglich waren, wurde mittels eines modifizierten Trinitrobenzolsulfonsäure(TNBS)/Adipinsäure-dihydrazid(ADH)-Tests (13) bestimmt. Kurz gesagt wurden 200 µl einer Lösung enthaltend 125-175 µg WGA in 20 mM HEPES, pH 7,4, mit 200 µl 0,02% TNBS in gesättigtem Natriumtetraborat/destilliertem Wasser (1+1, V/V) ge-

mischt und 10 min lang bei 70°C inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl 0,5 M wässriger ADH-Lösung und sanftem Schütteln am Vortex wurde die Absorption von Trinitrobenzol-adipinsäure-dihydrizon bei 520 nm abgelesen. Die Anzahl von Amino-Resten wurde aus einer Eichkurve unter Verwendung von ϵ -Amino-n-capronsäure berechnet. Der Test ermöglicht eine Quantifizierung von 80-680 nmol Amino-Resten/ml.

In vitro-Freisetzung von konjugiertem Doxorubicin.

Untersuchungen betreffend die *in vitro*-Freisetzung von DOX aus dem Konjugat wurden bei 37°C unter Lichtschutz durchgeführt. Ein kleiner Dialyse-Schlauch (MW cut-off 12 kDa) enthaltend 250 µl DOX-WGA, entsprechend 7,5 µg DOX, wurde in ein Schraubröhrchen, gefüllt mit 1,5 ml 0,1 M Phosphat/Citrat-Puffer, pH 4,0, gegeben. Um eine ungestörte Diffusion von freigesetztem DOX zu gewährleisten, wurden Luftblasen sorgfältig von der Oberfläche der Membran entfernt. Während das Dialyse-Medium gerührt wurde, wurden 500 µl Aliquots in regelmäßigen Abständen entnommen und sofort nach dem Ablesen der Absorption bei 468 nm in das Gefäß zurückgegeben. Die Menge des DOX, die vom Konjugat freigesetzt worden war, wurde aus einer DOX-Eichkurve errechnet.

Zellen und Kulturbedingungen

Die humane Colonkarzinom-Zelllinie Caco-2 und die humane Lymphblasten-Zelllinie MOLT-4 wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, ML, U.S.A.) erhalten. Die Zellen wurden in einem Kulturmedium bestehend aus RPMI-1640 mit 10% fötalem Kälberserum, 4 mM L-Glutamin und 75 µg/ml Gentamycin in einer angefeuchteten 5% CO₂/95% Luft-Atmosphäre bei 37°C gezüchtet und durch Trypsin-Behandlung subkultiviert.

Humane Colonozyten wurden aus normalem Gewebe angrenzend an eine resezierte Colonkarzinom-Probe erhalten. Das Gewebe wurde durch etwa einstündige Inkubation in Kollagenase-Lösung (1000 E/ml Medium) bei 37°C dissoziiert, bis einzelne Zellen freigesetzt waren, wie mittels Lichtmikroskopie gezeigt. Die Zellen wurden wiederholt mit PBS mit 5minütiger Zentrifugation bei 4°C bei

1300 U/min gewaschen. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, und das Präparat wurde unter Verwendung eines Casyl DT-Zellzähler- und Analysator-Systems (Schärfe, DE) analysiert. So bestand das Zell-Präparat aus 1×10^6 Colonozyten/ml (Durchmesser 7-10 μm), und 17×10^6 Zellen/ml, die einen Durchmesser von weniger als 7 μm aufwiesen, hauptsächlich rote Blutkörperchen, wie mittels Lichtmikroskopie beobachtet wurde.

Bindung von DOX-WGA an humane Colonozyten, Caco-2 und MOLT-4-Zellen

Unter Verwendung einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurden $50 \mu\text{l}$ Zellsuspension (5×10^4 Colonozyten oder Lymphoblasten) in PBS, $100 \mu\text{l}$ 20 mM HEPES, pH 7,4, und $50 \mu\text{l}$ einer Lösung enthaltend 3,6, 1,8 oder $0,9 \mu\text{g}$ DOX-WGA in HEPES 1h, 2h oder 12h lang bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000 U/min, 5 min, 4°C), und $120 \mu\text{l}$ des Überstands wurden verworfen. Nach Zugabe von $120 \mu\text{l}$ HEPES wurde der Wasch-Schritt auf dieselbe Weise wiederholt. Die Zellen wurden in $1,8 \text{ ml}$ Cell Pack resuspendiert und mittels Durchfluß-Zytometrie untersucht.

Bei jedem Experiment wurden negative Kontrollen bestehend aus unmarkierten Zellen zwecks Bestimmung der Autofluoreszenz inkludiert. Jede Konzentration wurde vierfach getestet und mindestens zweimal wiederholt.

Durchfluß-Zytometrie

Die Durchfluß-Zytometrie-Messungen wurden an einem Epics XL-MLC-Analyse-Durchfluß-Zytometer (Coulter, FL, U.S.A.) durchgeführt. Die markierten Zellen wurden unter Verwendung eines "Forward versus side scatter gate" zum Erfassen einzelner Zellpopulationen und Ausschluß von Zellrückständen und Zellaggregaten analysiert. Fluoreszenz wurde bei 575 nm nachgewiesen (10 nm Bandbreite), und der Mittelwert der Kanalzahl der logarithmischen Fluoreszenz-Intensitäten einzelner Peaks wurde für weitere Berechnungen verwendet. Die Amplifikation der Fluoreszenz-Signale wurde eingestellt, um das Autofluoreszenz-Signal unmarkierter Zellen in die erste Dekade des 4-Dekaden umfassenden log-Be-

reichs zu stellen. Für jede Messung wurden 5000 Zellen akkumuliert.

Konfokale Mikroskopie

Die Zellen wurden durch einstündige Inkubation von 100 µl Zell-Suspension (2×10^6 /ml HEPES) mit 100 µl einer Lösung von DOX-WGA (69 µg/ml HEPES) oder Fluorescein-markiertem WGA (100 µg/ml HEPES) bei 37°C gefärbt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 1000 U/min), zweimal wie oben beschrieben jedoch unter Verwendung von 150 µl HEPES gewaschen und zwecks Mikroskopie auf einen Träger aufgebracht. Konfokale Bilder von mittels Fluoreszenz markierten Zellen wurden unter Verwendung eines konfokalen Zeiss Axiovert-Mikroskops erhalten. Transmissionslicht und Fluoreszenz-Bilder wurden in 40-facher Vergrößerung erhalten, und intrazelluläres DOX sowie Fluorescein wurden durch Erregung bei 488 nm und Emission >515 nm nachgewiesen.

Zellproliferationstests

Die Zellproliferation wurde mit dem XTT- und dem BrdU-Test bestimmt, welche gemäß den Vorschriften der Hersteller unter Verwendung von farblosem supplementierten RPMI 1640-Medium für Zellkultur durchgeführt wurden.

Um den Einfluß von WGA und F-WGA auf die Zellproliferation von Caco-2 zu errechnen, wurden 100 µl Zell-Suspension (2×10^4 Zellen) und 75 µl je einer Verdünnungsreihe von WGA und F-WGA (0, 0,06, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 1,5, 3, 6 und 30 µg) unter Gewebskulturbedingungen für 3 Tage inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 20 µl XTT-Reagens-Lösung. Die Absorption des gebildeten Formazans wurde bei 450 nm (Anthos ELISA Reader 2001) gegen eine negative Kontrolle, bestehend aus Medium und XTT-Reagens-Lösung, bestimmt.

Die zytotoxische Aktivität von DOX-WGA wurde mittels des XTT-Tests, wie oben beschrieben, bestimmt, wobei jedoch 10^4 MOLT-4- oder Caco-2-Zellen/100 µl RPMI 1640-Medium und je 75 µl einer Lösung enthaltend DOX (0,15 oder 0,10 µg), WGA (0,45 oder 0,32

μg) bzw. DOX-WGA (0,57 oder 0,41 μg) verwendet wurden.

Außerdem wurde die Zellproliferation von Caco-2-Zellen, die mit DOX-WGA vorbehandelt worden waren, untersucht, wobei ein colorimetrischer Immuntest, der BrdU-Test, verwendet wurde. Je 75 ml einer Lösung enthaltend WGA (0,6, 0,43, 0,30 μg), DOX (0,15, 0,11, 0,075 μg) oder DOX-WGA (0,57, 0,41, 0,285 μg) in HEPES wurden in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte, die 100 μl Zell-Suspension (5×10^3 Caco-2-Zellen) enthielt, zugegeben. Nach 96stündiger Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurden 20 μl BrdU-Markierungslösung zugegeben, gefolgt von einer weiteren 14-stündigen Inkubation. Der Überstand wurde verworfen, und nach Zugabe von 200 μl FixDenat-Lösung waren die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Der Überstand wurde 30 min später entfernt, und 100 μl BrdU-Antikörper-Peroxidase wurden zugegeben. Nach 90-minütiger Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 200 μl Wasch-Puffer gewaschen, und 100 μl Substrat wurden zugegeben. Nach 10 min wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 25 μl 1M Schwefelsäure gestoppt, und die Absorption wurde bei 450 nm gegen den Leerwert, hergestellt wie oben beschrieben, doch unter Auslassung der Zellen, gemessen.

Alle Tests wurden vierfach durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt. Außerdem wurden in jedem Experiment positive Kontrollen durch Auslassen der untersuchten Substanzen inkludiert.

Ergebnisse

Herstellung und Charakterisierung von cis-Aconityl-gebundenem Doxorubicin-WGA (DOX-WGA)

Zur Verwendung von WGA als Carrier-Protein zur gezielten Prodrug-Zuführung von DOX wurde das zytostatische Mittel in einem zweistufigen Verfahren kovalent an das Protein gebunden. Zuerst wurde das Arzneimittel quantitativ in das entsprechende Carbonsäure-Derivat durch Umsetzen des freien Amino-Restes von Daunosamin mit cis-Aconitinsäureanhydrid übergeführt ($R_f\text{Produkt} = 0,21$, $R_f\text{DOX} = 0,14$; Chloroform/Methanol/Wasser, 9+9+1,8 (V/V/V)). Anders als in der Literatur beschrieben (12), ergab die Umsetzung N-

cis-Aconityl-DOX nur in wasserfreiem Medium. Trotz der Bildung von beidem, dem α - und dem β -Monoamid-Isomer, wurde nach DC nur ein Fleck beobachtet.

Um eine Quervernetzung von WGA durch Voraktivierung des Proteins zu vermeiden, wurde das N-cis-Aconitat-DOX mit Dicyclohexylcarbodiimid/N-Hydroxysuccinimid umgesetzt, um ein aktives Ester-Zwischenprodukt vor der Kopplung (14) zu bilden. Wie mittels DC (Chloroform/Methanol/Wasser 8+10+2,5 (V/V/V)) angezeigt, wurde das N-cis-Aconityl-Derivat ($R_f=0,24$) in den korrespondierenden N-Hydroxysuccinimid-Ester ($R_f=0,88$) in einem Ausmaß von etwa 75% übergeführt. Unter Beteiligung des aktiven Esters entweder des β - oder des γ -Carboxyl-Rests von cis-Aconitat-Doxorubicin wurde das Arzneimittel mit den zugänglichen Amino-Resten von WGA konjugiert, wobei eine Amid-Bindung gebildet wurde. UV-Differenzspektroskopie des gereinigten Konjugats bestätigte eine kovalente Bindung von DOX am Carrier-Protein, was zu einer Konjugationszahl von etwa 24 mol DOX/mol WGA führt. Da WGA eine Mischung von Isolektinen enthaltend $24 \pm 1,53$ Aminogruppen (Mittelwert \pm SD, n=6) darstellt, wie mittels TNBS/ADH-Test bestimmt, ergab die Kopplungsreaktion dicht beschichtetes Lektin, das jedoch noch immer frei wasserlöslich ist.

Da vom cis-Aconityl-Spacer berichtet worden war, daß er eine pH-empfindliche Bindung (15) für die intralysosomale Freisetzung des konjugierten Arzneimittels sei, wurde das Freisetzung-Profil von konjugiertem DOX bei pH 4,0 *in vitro* spektrophotometrisch bestimmt, wobei ein Dialyseeschlauch zum Ausschließen des Konjugats verwendet wurde. Innerhalb von 24 h Inkubation bei einem pH-Wert von 4,0 wurden $46 \pm 7\%$ konjugiertes DOX von WGA freigesetzt; nach einer längeren Inkubation stieg jedoch die Freisetzungsrate nicht deutlich an, da die 168ständige Einwirkung von saurem Milieu auf DOX-WGA zu einer Freisetzung von $51 \pm 6\%$ konjugiertem DOX führte. Wie durch das Freisetzung-Profil angezeigt, war die Hälfte des verfügbaren Arzneimittels nach 65 min freigesetzt (Fig. 1).

Zur Bestimmung der Konjugat-Bindungskapazität von Ziel- und Nicht-Zielzellen ließ man zunehmende Mengen von DOX-WGA mit einer bestimmten Anzahl von Zellen verschiedenen Ursprungs in Wechselwirkung treten und untersuchte sie mittels Durchfluß-Zytometrie. Diese Technik ermöglicht eine Quantifizierung nur der an Zellen gebundenen Fluoreszenz-Intensität (16). Caco-2-Zellen wurden als Vertreter für maligne transformierte Zellen verwendet, während humane Colonozyten und die humanen lymphoblastischen MOLT-4-Zellen als Modell für nicht beeinflußte bzw. Stammzellen inkludiert wurden. Im Vergleich zur Autofluoreszenz der Zellen ($0,6 \pm 0,1$) nahm der Mittelwert der an Zellen gebundenen Fluoreszenz-Intensität der Caco-2-Zellen nach Zugabe von DOX-WGA deutlich zu und ergab $11,8 \pm 0,7$ - $37,9 \pm 0,1$ relative Fluoreszenz-Intensität gleichzeitig mit einer zunehmenden Konzentration des Konjugats. Dagegen führte die Bindung zunehmender Mengen von DOX-WGA an Nicht-Zielzellen zu einer eher geringen und wenig ansteigenden, an Zellen gebundenen Fluoreszenz-Intensität im Bereich von $2,4 \pm 0,05$ bis $8,5 \pm 1,0$ (humane Colonozyten) bzw. $2,5 \pm 0,07$ bis $9,3 \pm 0,1$ (MOLT-4). Da der Mittelwert der an Zellen gebundenen Fluoreszenz-Intensität nach Zugabe zunehmender Mengen von DOX-WGA zunahm, könnte die Bindung an die untersuchten Zelllinien einer spezifischen Wechselwirkung zugeschrieben werden (Fig. 2).

Da die Präparation humaner Colonozyten 94% Zellen verschiedener Art enthielt, hauptsächlich Erythrozyten, wurde die Konjugat-Bindung durch Einstellen des "Forward versus side scatter gate" untersucht, um ausschließlich die Zell-Population von $< 7 \mu\text{m}$ aufzuzeichnen. Da die mittlere relative Fluoreszenz-Intensität von 0,3 den Autofluoreszenz-Bereich dieser Zellen abdeckte, kann die DOX-WGA-Bindung an Erythrozyten vernachlässigt werden.

Im allgemeinen war die DOX-WGA-Bindungskapazität von Caco-2-Zellen $4,6 \pm 0,3$ -mal höher als jene humaner Colonozyten. Die Menge des an MOLT-4-Zellen gebundenen DOX-WGA war in derselben Größenordnung wie die von humanen Colonozyten, nur $10 \pm 3\%$ höher. Nicht nur die Bindung an die Caco-2-Membran, sondern auch die Aufnahme von DOX-WGA wurde durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von lebensfähigen Caco-2-Zellen, die mit dem Konjugat vorinkubiert

worden waren, beobachtet (Fig. 3). Nach einstündiger Inkubation bei 37°C sammelte sich das fluoreszierende DOX-WGA-Konjugat in der Nähe der Kernmembran der sich teilenden Caco-2-Zelle an. Dagegen wurde, wenn Caco-2-Zellen mit Fluorescein-markiertem WGA unter denselben Bedingungen gefärbt wurden, das Lektin über das Zytoplasma verteilt, wobei einige intensiv gefärbte granulare Bereiche vorlagen, was eine vesikuläre Akkumulation anzeigt. So mit folgt auf die Zellbindung des Konjugats die Aufnahme des Prodrugs, wobei jedoch das intrazelluläre Verteilungsmuster von der für die Konjugation verwendeten Substanz abhängig ist.

Antiproliferative Wirkungen von DOX-WGA auf Tumorzellen und Lymphoblasten

Die Wirkung von WGA, F-WGA, DOX und DOX-WGA auf das Wachstum von Tumorzellen wurde mittels des XTT-Tests untersucht. Bei diesem Test wird das Tetrazol-Salz XTT durch lebensfähige Zellen metabolisch reduziert, die das lösliche, stark gefärbte Formazan ergeben, das ein Indikator für die Zellproliferation ist. Obwohl WGA die Proliferation von Caco-2-Zellen in Dosis-abhängiger Weise inhibierte und eine 50% Hemmung des Zellwachstums (IC_{50}) bei 530 ± 40 ng WGA/ 2×10^4 Caco-2-Zellen zeigte, wie aus einer sigmoidalen Kurve nach Boltzman errechnet, hatten WGA-Konzentrationen von <60 ng/Vertiefung keinen wesentlichen Einfluß auf das Zellwachstum (Fig. 4). Dagegen veränderte eine Markierung von WGA unter Verwendung von Fluorescein-Isothiocyanat die Hemmaktivität des Lektins und führte zur $IC_{50} = 623 \pm 84$ ng F-WGA/ 2×10^4 Caco-2-Zellen. Außerdem stimulierte nach Zugabe geringerer Mengen als 54 ng F-WGA das markierte Lektin die Proliferation von Caco-2-Zellen.

Unter Berücksichtigung des Einflusses des nicht-modifizierten Carrier-Proteins auf die Hemmaktivität von DOX-WGA waren die Konzentrationen von WGA und DOX, die im XTT-Test angewendet wurden, gleich dem Konjugat, um eine Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten vorzusehen. Während WGA das Caco-2-Zellwachstum in einem Ausmaß von $40,3 \pm 14,6\%$ (bei 450 ng WGA/ 10^4 Zellen) und $6,7 \pm 3,3\%$ (bei 320 ng WGA/ 10^4 Zellen) hemmte, nahm die zytostatische Aktivität von DOX-WGA auf Caco-2-Zellen zu bei einer

gleichzeitigen Abnahme der WGA-Konzentrationen um $14,3 \pm 8,3\%$ bzw. $34,0 \pm 6,1\%$ (Fig. 5A). Anderseits ergaben äquivalente Mengen von DOX-WGA 63% oder 46% der antiproliferativen Wirkung von DOX.

Im Vergleich zu Caco-2-Zellen übten gleiche Mengen der untersuchten Substanzen einen geringeren Einfluß auf die Lebensfähigkeit lymphoblastischer MOLT-4-Zellen aus (Fig. 5B). Während DOX das Zellwachstum in einem Ausmaß von etwa $13 \pm 5,2\%$ hemmte, betrug die Hemmaktivität von DOX-WGA auf MOLT-4-Zellen $9,4 \pm 3,2\%$ (bei $450 \text{ ng}/10^4$ Zellen) bzw. $5,0 \pm 2,6\%$ (bei $320 \text{ ng}/10^4$ Zellen).

Im Gegensatz zum XTT-Test war der Einfluß des Carrier-Proteins alleine auf die Proliferation von Caco-2-Zellen ein ganz anderer, wie mittels Quantifizierung des DNA-Gehalts durch den BrdU-Test bestimmt. Während die Konzentration des Carrier-Proteins von 600 auf 300 ng WGA/5000 Zellen abnahm, wurde anfänglich keine wesentliche Hemmwirkung ($4,6 \pm 12,3\%$) beobachtet, doch wurde diese Wirkung in eine zunehmende Stimulation des Caco-2-Zellwachstums umgewandelt (Fig. 6). Anderseits zeigten im Vergleich zu DOX-WGA, äquivalente Mengen des freien Arzneimittels eine hohe zytostatische Aktivität, was zu einer Wachstumshemmung von durchschnittlich $95,2 \pm 2,1\%$ führte. Nach Vorinkubation von Caco-2-Zellen mit DOX-WGA nahm die antiproliferative Aktivität äquivalenter Dox-Mengen um $20 \pm 5,6\%$ ab.

Diskussion

Um einen Vorteil aus der sehr verschiedenen WGA-Bindungskapazität von Caco-2-Zellen und humanen Colonozyten für die zielgerichtete Zufuhr von Arzneimitteln zu Colonkarzinom-Zellen *in vitro* (11) zu ziehen, wurde DOX durch einen zweistufigen Mechanismus über eine säureempfindliche *cis*-Aconitinsäure-Bindung kovalent an WGA gekoppelt (12). Da WGA eine Mischung aus vier Isolektinen (17) darstellt, wurde für die Bewertung der Kopplungs effizienz durch eine Kombination des TNBS-Tests mit ADH festgestellt, daß die Anzahl der Amino-Reste an WGA $24 \pm 1,4$ ist. Die Kopplung wurde qualitativ und quantitativ durch UV/VIS-Differenz-Spektroskopie bestätigt und ergab ein Konjugat frei von nachweisbarem, nicht-kovalent gebundenem Arzneimittel, das 24

Mol DOX/Mol WGA enthielt. Trotz einer Derivatisierung fast aller zugänglichen Amino-Reste von WGA wurde die Wasserlöslichkeit von DOX-WGA beibehalten. Gemäß der Literatur (15) war die cis-Aconityl-Bindung zwischen dem Arzneimittel und WGA pH-empfindlich, wobei sie bei pH 7,0 stabil war, und wies eine Halbwertszeit von 1 h bei pH 4,0 auf. Innerhalb von 168 h wurden jedoch nur 50% des Arzneimittelgehalts aus DOX-WGA freigesetzt, im Vergleich zu einer fast 100% Freisetzung des mit einem Antikörper konjugierten Daunomycin bei einem pH-Wert von 3,0 (14). Bei unserer Arbeit wurde N-cis-Aconityl-Doxorubicin in aprotischen Milieu aktiviert, was vermutlich gleiche Mengen des N-Hydroxy-Succinimidesters von sowohl β - als auch γ -Carboxyl ergab. Da eine freie cis-Carbonsäure-Funktion eine Voraussetzung für eine pH-Empfindlichkeit der Bindung ist (15), kann die Freisetzung von lediglich der Hälfte des konjugierten DOX der Bildung einer Amid-Bindung zwischen WGA und dem β -Carboxyl des α -Monoamid-Isomers von N-cis-Aconityl-Doxorubicin zuzuschreiben sein.

Wie mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie von F-WGA und DOX-WGA bestätigt wurde, behielt das N-Acetylglucosamin-spezifische Lektin seine bioadhäsiven und cytoinvasiven Eigenschaften nach Konjugation des zytostatischen Mittels bei. Infolge der Säureempfindlichkeit der Bindung wird eine intralysosomale Freisetzung von konjugiertem DOX erwartet, wenn DOX-WGA das saure Milieu des lysosomalen Kompartiments erreicht. Als Folge der Derivatisierung wurde das intracelluläre Verteilungsmuster von WGA verändert, was zur Akkumulation von DOX-WGA nahe der Kernmembran von Caco-2-Zellen führte.

Die Bindungs-Spezifität des Konjugats wurde mittels durchflußzytometrischer Bestimmung von zellgebundener Fluoreszenz-Intensität, die von DOX-WGA stammt, bewertet. Unabhängig von der Einwirkungszeit zeigte DOX-WGA eine Dosis-abhängige Bindung an Ziel- und Nicht-Zielzellen, wobei jedoch das Ausmaß sehr verschieden war. Im Durchschnitt überstieg die Bindungskapazität der Colonkarzinom-Zellen Caco-2 jene der humanen Colonozyten und lymphoblastischen MOLT-4-Zellen um ein 4,5-Faches. Außerdem wurde keine Bindung von DOX-WGA an humane Erythrozyten nachgewiesen. Diese Ergebnisse sind Indikatoren für eine hohe Ziel-Spezi-

fität des Konjugats. Unter Berücksichtigung des hohen Ausmaßes der Kopplung könnte das abnehmende Verhältnis der Bindung an Caco-2-Zellen gegenüber humanen Colonzyten von 13:1 (F-WGA, 11) auf 4:1 (DOX-WGA) mit einer dichten Derivatisierung des Lektins durch das hydrophobe Anti-Krebs-Arzneimittel in Verbindung stehen, wie sie für Immunkonjugate beobachtet wurde (18).

Als die Auswirkungen von WGA und F-WGA auf die Mitose untersucht wurden durch Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität, wurden gemäß Ryder et al. (19) reversierende Wirkungen auf das Zellwachsum von Caco-2 beobachtet: bei vergleichbaren Konzentrationen zeigte das native Lektin eine Dosis-abhängige Hemmung des Caco-2-Zellwachstums, doch nach Konjugation des Fluoresceins kehrte sich diese Hemmwirkung um in eine Stimulation bei Konzentrationen von $<54 \text{ ng F-WGA}/2 \times 10^4 \text{ Zellen}$. Wie von Kawamoto et al. (20) beobachtet, hemmte der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) die Proliferation von epidermoiden A431-Karzinom-Zellen im nM-Bereich, hatte jedoch eine mitogene Wirkung im pM-Bereich. Da die Tyrosin-Kinase-Aktivität des EGF-Rezeptors durch WGA in einem ähnlichen Ausmaß aktiviert wurde wie die durch den epidermalen Wachstumsfaktor induzierte Verbesserung (21), ist diese Wirkung möglicherweise auf eine EGF-Rezeptor-Bindung von WGA zurückzuführen.

Der Beitrag des Carrier-Proteins von DOX-WGA zur antiproliferativen Wirkung des Kojugats auf Caco-2-Zellen war jedoch ziemlich gering, da die Hemmaktivität äquivalenter Mengen von WGA und DOX-WGA $6,7 \pm 3,3\%$ bzw. $39 \pm 6,1\%$ betrug. Somit stammt die zytostatische Aktivität von DOX-WGA haupsächlich vom konjugierten Arzneimittel und ergibt etwa 60% der zytostatischen Aktivität von freiem DOX. Bei Durchführung des XTT-Tests mit lymphblastischen MOLT-4-Zellen als Modell für Nicht-Zielzellen wurde das Zellwachstum durch DOX-WGA in Dosis-abhängiger Form im Vergleich zu freiem DOX (100%) in einem Ausmaß von bestenfalls 35% gehemmt. Diese abnehmende antiproliferative Aktivität äquivalenter Mengen von DOX auf Nicht-Zielzellen könnte der zielgerichteten Zuführung des Anti-Krebs-Mittels nach Konjugation mit WGA zuzuschreiben sein.

Da ein unbeeinträchtigtes Wachstum von mit äquivalenten Mengen des Carrier-Proteins vorinkubierten Caco-2-Zellen für eine eindeutige Berechnung der antiproliferativen Aktivität von DOX-WGA notwendig ist, wurde die BrdU-Inkorporierung während der DNA-Synthese entsprechend der Anzahl der sich teilenden Zellen bestimmt. Bei äquivalenten Konzentrationen von WGA und DOX im Vergleich zu DOX-WGA, hemmte das Carrier-Protein alleine das Caco-2-Zellwachstum nur geringfügig oder stimulierte es, und das freie Arzneimittel zeigte im Durchschnitt eine 95% Wachstumshemmung. Die antiproliferative Wirkung von konjugiertem DOX hatte einen Mittelwert von 78%. Wenn man eine nur 50% Freisetzung von gebundenem DOX *in vitro* annimmt, könnte die zytostatische Wirkung von DOX-WGA infolge der stellen-spezifischen Effizienz von konjugiertem DOX gleich oder etwas höher sein als jene des freien Arzneimittels.

Literaturstellen:

1. R. Duncan, T.A. Connors und H. Meada, Drug targeting in cancer therapy: the magic bullet, what next? *J. Drug Targeting* 3:317-319 (1996).
2. G.R. Thrush, L.R. Lark, B.C. Clinchy und E.S. Vitella, Immunotoxins: an update. *Ann. Rev. Immunol.* 14:49-71 (1996).
3. F. Gabor, I. Haberl, M. Wirth, K. Richter, G. Theyer, G. Baumgartner, H. Wenzl und G. Hamilton. In vitro antitumor activity of MIC2 protein-doxorubicin conjugates. *Int. J. Onc.* 9:527-531 (1996).
4. S.S. Davis und L. Illum. Colloidal carriers and drug targeting. *Acta Pharm. Technol.* 32:4-9 (1986).
5. J. Kreuter. Nanoparticulate systems in drug delivery and targeting. *J. Drug Targeting*. 3:171-173 (1995).
6. N. Sharon und H. Lis, Lectins: cell agglutination and sugar specific proteins. *Science* 177:949-959 (1972).
7. C.M. Lehr in Lectins-Biomedical Perspectives. A. Pusztai und S. Bardocz (Hersg.) Taylor & Francis Ltd., London 1995.
8. A. Shanghai und S. Hakamori. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioessays* 12:223-230 (1990).
9. I.E. Liener, N. Sharon und I.E. Goldstein, The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine, Academic Press, Orlando, Florida, 1986.
10. A. Pusztai, S.W.B. Ewen, G. Grant, D.S. Brown, J.C. Stewart, W.J. Peumans, E.J.M. van Damme und S. Bardocz, Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetyl-glucosamine-specific lectins. *Br.J.Nutr.* 70:313-321 (1993).

11. F. Gabor, M. Wirth, G. Walcher und G. Hamilton. Lectin-mediated Bioadhesion: Gastrointestinal stability and Binding-characteristics of Wheat Germ Agglutinin and *Solanum Tuberosum* Lectin on Caco-2, HT-29 and Human Colonocytes. *J. Contr. Rel.* 49:27-37 (1997).
12. H.S. Yang und R.A. Reisfeld. Doxorubicin conjugated with a monoclonal antibody directed to a human melanoma-associated proteoglycan suppresses the growth of established tumor xenografts in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:1189-1193 (1988).
13. M. Wilchek, T. Miron und J. Kohn. Affinity chromatography. *Methods Enzymol.*, 104:3-55 (1981).
14. R.O. Dillman, D.E. Johnson, D.L. Shawler und J.A. Koziol. Superiority of an acid-labile daunorubicin-monoclonal antibody immunoconjugate compared to free drug. *Cancer Res.* 48: 6079-6102 (1988).
15. W.C. Shen und H.J.-P. Ryser. Cis-aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers: a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 102:1048-1054 (1981).
16. M. Ramanathan. Flow cytometry applications in pharmacodynamics and drug delivery, *Pharm. Res.* 14:1106-1114 (1997).
17. K.A. Kronis und J.P. Carver. Specificity of isolectins of wheat germ agglutinin for sialyloligosaccharides: a 360-Mhz proton nuclear magnetic resonance binding study, *Biochemistry* 21: 3050-3057 (1982).
18. Z. Brich, S. Ravel, T. Kissel, J. Fritsch und A. Schoffmann. Preparation and characterization of a water soluble dextran immunoconjugate of doxorubicin and the monoclonal antibody (ABL364). *J. Contr. Rel.* 19:245-258 (1992).

010808

- 21 -

19. S.D. Ryder, J.A. Smith, E.G. Rhodes, N. Parker und J.M. Rhodes. Proliferative responses of HT-29 and Caco-2 human colorectal cancer cells to a panel of lectins. *Gastroenterology* 106:85-93 (1994).
20. T. Kawamoto, J.D. Sato, A. Le, J. Polikoff, G.H. Sato und J. Mendelsohn. Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: Identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1337-1341 (1983).
21. F.Y. Zeng, A. Bengurfa, S. Kafert, S. Andre, H.J. Gabius und A. Villalobo. Differential response of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity to several plant and mammalian lectins, *Mol. Cell Biochem.* 142:117-124 (1995).
22. W.Yin und P.W. Cheng. Lectin conjugate-directed gene transfer to airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205:826-833 (1994).

P a t e n t a n s p r ü c h : :

1. Pharmazeutisches Präparat, umfassend ein Lektin, an das ein aus Blut gewinnbares Protein, insbesondere ein Blutgerinnungsfaktor, oder dessen rekombinantes Äquivalent verabreichungsstabil gebunden ist.
2. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein pflanzliches Lektin ist.
3. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ausgewählt ist aus Concanavalin A, Abrin, Ricin, Phasin oder WGA, insbesondere WGA.
4. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die verabreichungsstabile Bindung zwischen Lektin und dem Protein eine säurelabile, kovalente Bindung ist.
5. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die verabreichungsstabile Bindung zwischen Lektin und dem Protein durch eine Protease, die spezifisch für Zielkompartimente ist, gespalten wird.
6. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein modifiziertes Lektin ist.
7. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein an seinem Zielkompartiment zum Arzneimittel modifiziertes Lektin ist.
8. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein an seiner Bindungsstelle zu Zielkompartimenten modifiziertes Lektin ist.
9. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es zur peroralen Verabreichung kon-

fektioniert ist und gegebenenfalls eine magensaftresistente Hüllschicht aufweist.

10. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das WGA ist und das Protein über die säurelabile cis-Aconityl-Bindung verbunden ist.

11. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es als Prodrug-Formulierung vorliegt.

DA/Se

010000

- 24 -

Z u s a m m e n f a s s u n g :

Beschrieben wird ein pharmazeutisches Präparat, umfassend ein Lektin, an das ein aus Blut gewinnbares Protein verabreichungs-stabil gebunden ist.

Fig. 1

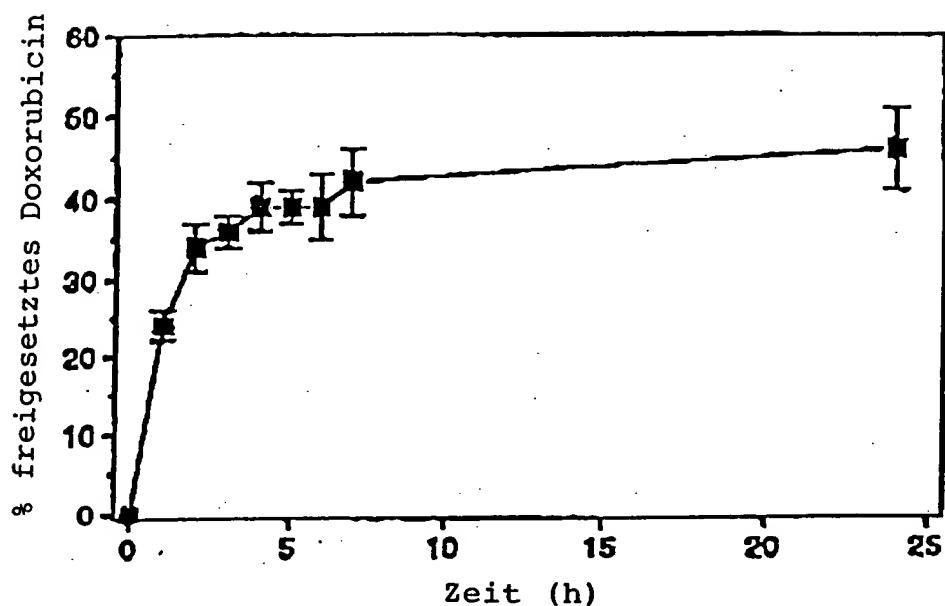


Fig. 1. In vitro-Freisetzungsprofil von DOX aus DOX-WGA in 0,1 M Zitrat/Phosphat-Puffer, pH 4,0, bei 37°C (n = 3, Mittelwert ± S.A.)

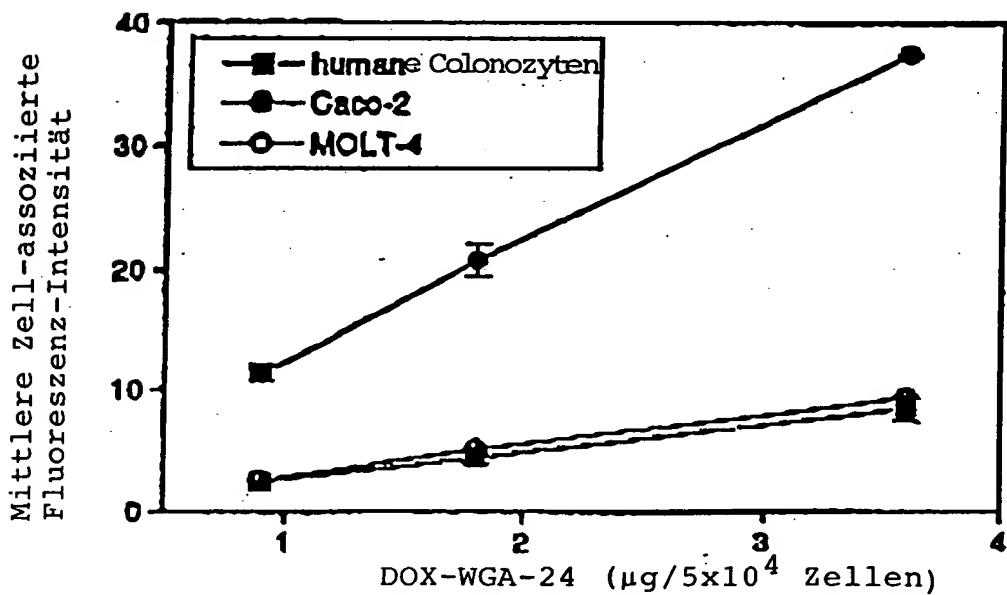


Fig. 2. Zell-gebundene Fluoreszenz-Intensität von DOX-WGA, bei 4°C 2 h lang inkubiert mit humanen Colonozyten, MOLT-4- und Caco-2-Zellen, nach Subtraktion der Autofluoreszenz der Zellen (n = 8, Mittelwert ± S.A.)

A 701/99-1 010006

Urtext

2/4

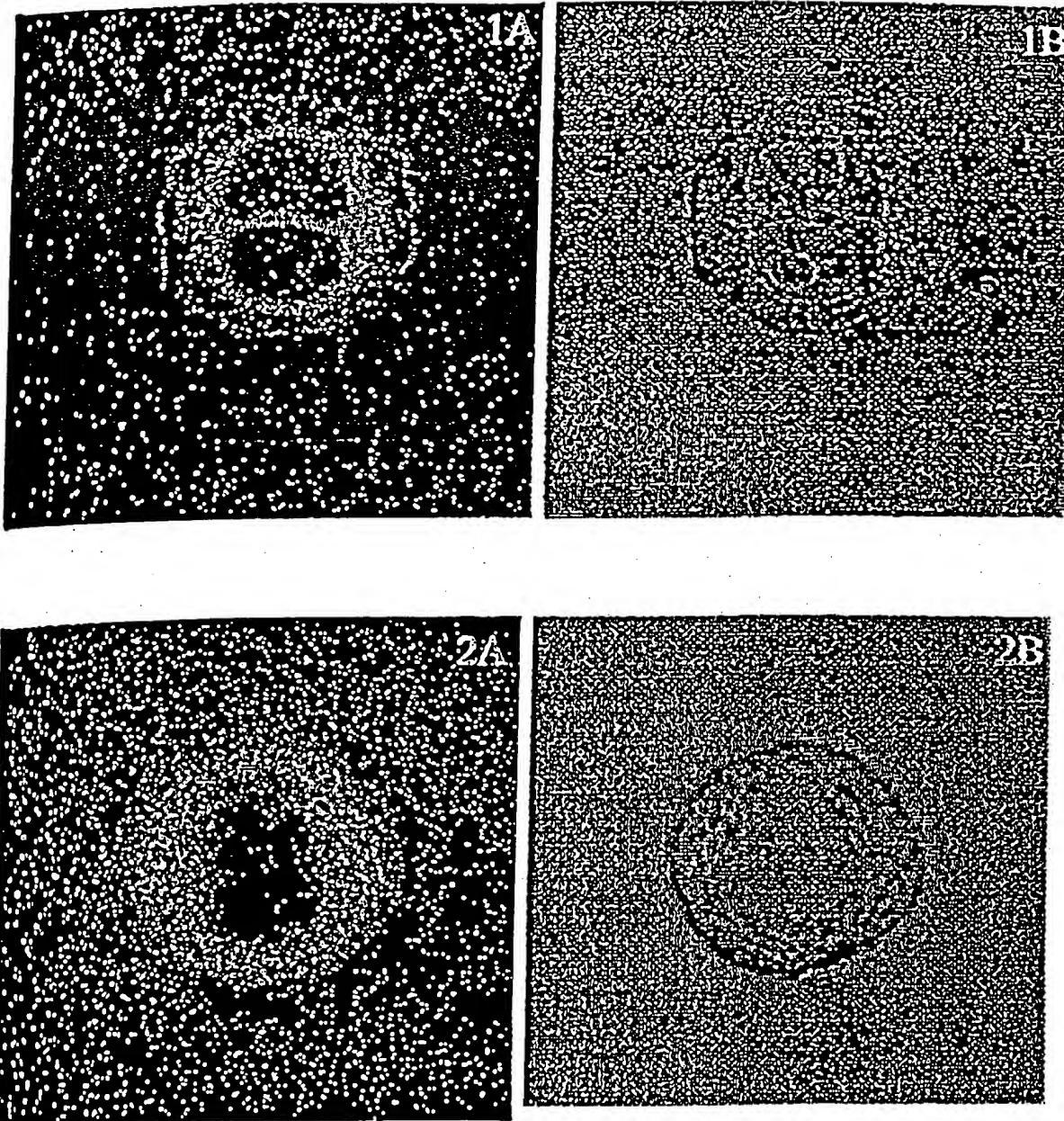


Fig. 3. Konfokale Fluoreszenz-(A) und Transmissionslicht-(B)-Mikroskopie-Bilder von Caco-2-Zellen, inkubiert mit DOX-WGA (1A) und Fluorescein-markiertem WGA (2A). Der Zelldurchmesser beträgt etwa 20 μ m.

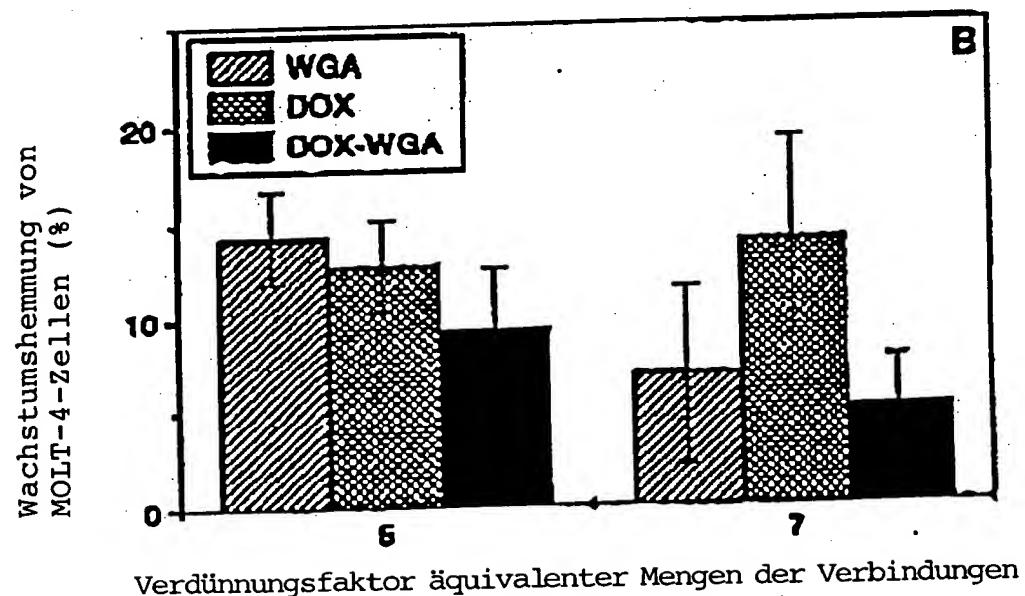
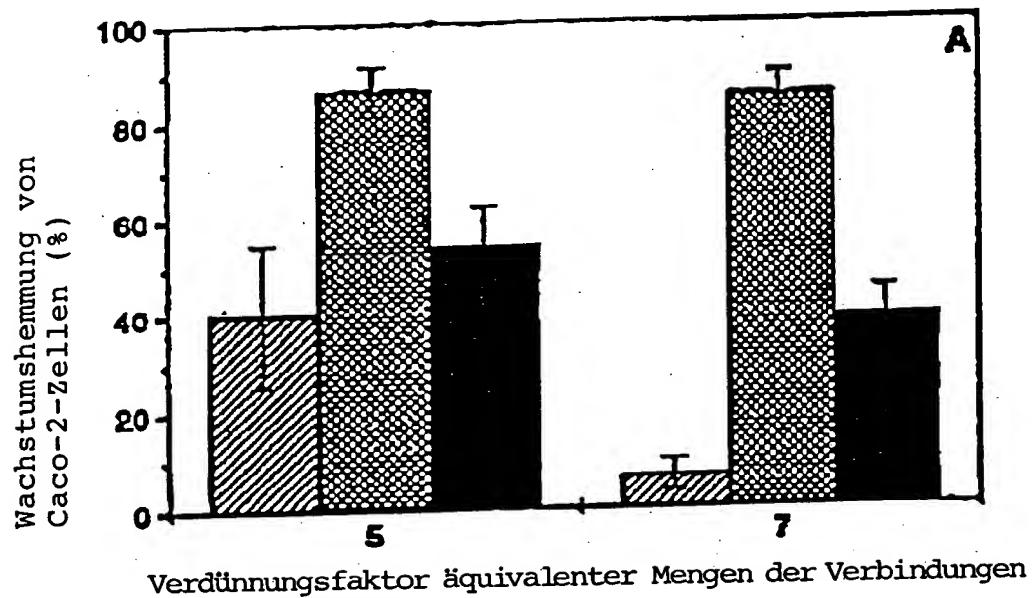


Fig. 5. Antiproliferative Wirkung von WGA, DOX-WGA und DOX bei äquivalenten Konzentrationen auf Caco-2- (A) und MOLT-4-Zellen (B), wie mittels XTT-Test festgestellt ($n = 8$, Mittelwert \pm S.A.)

4/4

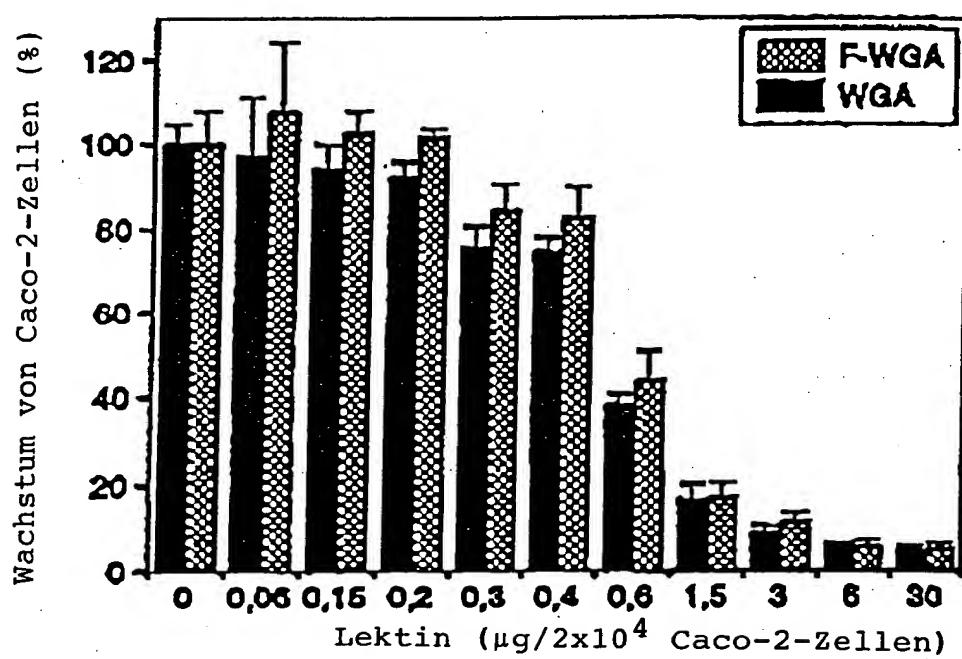


Fig. 4. Wirkung von F-WGA und WGA auf Caco-2-Zellwachstum, wie mittels XTT-Test festgestellt ($n = 8$, Mittelwert \pm S.A.)

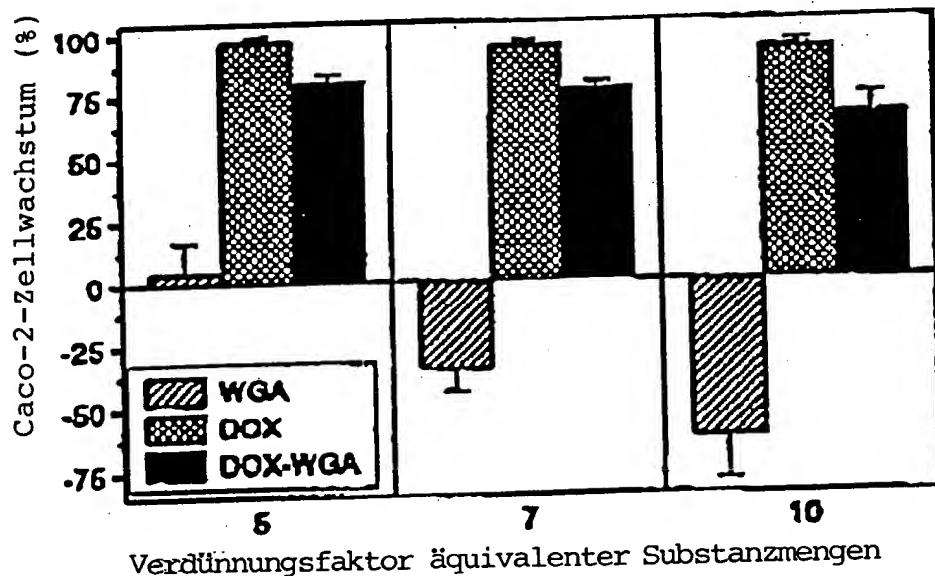


Fig. 6. Wirkung äquivalenter Mengen von WGA, DOX-WGA und DOX auf Caco-2-Zellwachstum, wie mittels BrdU-Test festgestellt ($n = 8$, Mittelwert \pm S.A.)

